

И. В. Шилова<sup>1</sup>, А. А. Семёнов<sup>2</sup>, Н. В. Кувачёва<sup>3</sup>, Н. И. Суслов<sup>1</sup>, Р. Н. Мустафин<sup>1</sup>

## ВЫДЕЛЕНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И НООТРОПНАЯ АКТИВНОСТЬ ВЕЩЕСТВ ХЛОРОФОРМНОЙ ФРАКЦИИ ЭКСТРАКТА АЛЬФРЕДИИ ПОНИКШЕЙ

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт фармакологии СО РАМН, Томск, Россия;

<sup>2</sup> Иркутский технический университет, Иркутск, Россия;

<sup>3</sup> Красноярский государственный медицинский университет, Красноярск, Россия

В результате исследования химического состава хлороформной фракции экстракта надземной части *Alfredia cernua* (L.) Cass на 95 % этаноле выделены тритерпеновые спирты ( $\alpha$ -амирин,  $\beta$ -амирин, моретенол, лупеол) и бутиролигнан (арктиин), обнаружены различные представители простых фенолов, органических кислот и их эфиров. Установлено, что сумма тритерпеновых спиртов и арктиин обладают ноотропной активностью, сопоставимой с эффективностью фракции.

**Ключевые слова:** тритерпеновые спирты, арктиин, ноотропная активность, *Alfredia cernua* (L.) Cass.

Экстракты надземной части альфредии поникшей (*Alfredia cernua* (L.) Cass.) проявляют ноотропную активность [1], наиболее выраженный эффект присущ экстракту растения на 95 % этаноле [2, 3]. Хлороформная фракция экстракта проявляет выраженную антигипоксическую, антиоксидантную и анксиолитическую активность.

В надземной части растения обнаружены простые фенолы, флавоноиды (кверцетин и его гликозиды, кемпферол, таксифолин, апигенин, лютеолин), фенолкарбоновые кислоты (ванилиновая, кофейная, хлорогеновая), дубильные вещества (следовые количества), гидроксикумарины, тритерпеновые соединения, стериды, полисахариды, каротиноиды и аминокислоты [4 – 6].

Целью работы явилось хроматографическое разделение хлороформной фракции экстракта альфредии поникшей на 95 % этаноле, выделение индивидуальных соединений, их идентификация и изучение ноотропных свойств.

### Экспериментальная химическая часть

Надземную часть альфредии поникшей собирали в августе 2006 г. в фазу цветения — начала плодоношения в окрестностях перевала Ябочанский Усть-Канского района Республики Горный Алтай. Высушенное воздушным способом сырье измельчали и просеивали через сито с диаметром отверстий 2 – 4 мм (влажность 11,6 %).

Экстракт получали обработкой измельченной надземной части растения 95 % этанолом трижды на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин при температуре 80 °С и соотношении сырье – экстрагент 1:15. Полученные извлечения объединяли, фильтровали и упаривали в вакууме при температуре не выше 60 °С. Экстракт содержит 0,66 % флавоноидов в пересчете на изокверцитрин; сухой остаток составляет не менее 16 %. Полученный экстракт (выход 11,7 %) растворяли в воде (1:4) и исчерпывающе экстрагировали в делительной воронке хлороформом. Полученную хлороформную фракцию также упаривали в вакууме (выход 31,4 %).

Разделение сложных смесей веществ и выделение индивидуальных соединений осуществляли, используя методы избирательной жидкостной экстракции, адсорбци-

онной колоночной и флэш-хроматографии на силикагеле и полиамиде в сочетании с хроматографией на бумаге и в тонком слое сорбента, хроматомасс-спектрометрией, противоточным распределением и дробной кристаллизацией.

Хроматомасс-спектрометрическое исследование (ГХ/МС) выполняли на приборе Trace DSQ (Thermoelectron corp., США) с программным обеспечением Xcalibur 1.4. В работе использовали колонку ВРХ5 (25 м), объем газа-носителя (гелия) составил  $V_{гн} = 1$  мл/мин, скорость нагрева — 15 °/мин. В качестве растворителя использовали хлороформ. Рабочая температура испарителя составила 280 °С, термостата — от 70 до 290 °С (при 290 °С — 90 мин). Задержка хроматограммы при исследовании равна 3,5 – 5 мин. Детекция с помощью масс-детектора с энергией ионизирующих ионов 70 эВ. Сканирование проводили в пределах 33 – 650 а.е.м. Идентификацию осуществляли путем сравнения времени удерживания и полных масс-спектров с соответствующими данными из базы Wiley 275, Wiley7N. L и Nisto5.L.

Температуру плавления определяли на столике Кофлера. Оптическое вращение измеряли при 580 нм на поляриметре “Polamat А”. УФ-спектры получали на спектрофотометре “UNIKON 943” (Италия) Dable Beam UV/vis Spektrophotometer, ИК-спектры — на приборе “Nikolet 5700” (США) (FT-IR). Спектры ЯМР записывали на спектрометре “Bruker DRX-400”. Данные <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C спектров ЯМР приведены в табл. 1. С использованием метода HSQC выявлены химические сдвиги <sup>13</sup>C атомов, связанных с протонами (С-Н корреляция). Связи <sup>13</sup>C (особенно для четвертичных атомов) и <sup>1</sup>H атомов через 3 – 5 связей установлены HMBC-корреляцией. Химические сдвиги <sup>1</sup>H между соседними атомами определены методом COSY. Относительная стереохимия молекул изучена путем анализа кросс-пиков между протонными сигналами в спектрах ROESY и NOESY.

Фармакологические испытания проводили на 60 беспородных мышах-самцах массой 20 – 22 г. Животные категории 1 (конвенциональные линейные мыши) получены из коллекционного фонда лаборатории экспериментального биологического моделирования НИИ фармако-

логии СО РАМН (есть сертификат). Эксперименты осуществляли в зимне-весенний период. Работы в рамках экспериментальных методик выполняли с 9 ч утра и заканчивали к 15 ч. Животных содержали в стандартных условиях вивария на обычном рационе кормления. Умерщвление животных осуществляли передозировкой эфирного наркоза в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными приказом МЗ СССР. Экстракт, фракцию и вещества вводили животным курсом ежедневно 1 раз в день через зонд в желудок в виде взвеси в воде за 1 ч до начала экспериментальных манипуляций. Экстракт вводили в дозе 100 мг/кг, фракцию и индивидуальные вещества — в эквивалентных дозах по содержанию в экстракте. Животные контрольных групп получали эквивалентное количество воды.

Антигипоксическую активность оценивали в условиях гипоксии гермообъема, функциональное состояние ЦНС — на модели «открытое поле»; антиамнестическое действие исследовали при выработке и воспроизведении условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) [7].

Экспериментальные данные обрабатывали статистически с использованием *t* критерия Стьюдента, непараметрического критерия Вилкоксона и метода Фишера для сравнения долей.

### Результаты и их обсуждение

Первоначальное исследование химического состава хлороформной фракции, осуществленное с помощью качественных реакций и метода хроматографии в тонком слое и на бумаге в сравнении с достоверными образцами, позволило обнаружить пигменты (хлорофилл), стерины ( $\beta$ -ситостерин), тритерпеновые соединения, гидроксикумарины (эскулетин), ароматические кислоты (бензойная, салициловая, ванилиновая). Использование ГХ/МС анализа (рис. 1) позволило дополнительно обнаружить во фракции альфредии наличие силвестрена (1-метил-5-(1-метилэтенил)-циклогексен, 0,02 %,  $t_r$  7,39 мин), фенилэтилена (0,62 %,  $t_r$  5,71 мин), бензилового спирта (0,05 %,  $t_r$  7,54 мин), ванилина (0,19 %,  $t_r$  11,48 мин), сиреневого альдегида (0,15 %,  $t_r$  13,65 мин), бензойной кислоты (0,07 %,  $t_r$  8,8 мин), диэтилфталата (9,59 %,  $t_r$  12,94 мин), моно(2-этилгексил)фталата (3,56 %,  $t_r$  20,2 мин), салициловой кислоты (0,46 %,  $t_r$  10,22 мин) и её этилового эфира (0,1 %,  $t_r$  10,15 мин), галловой кислоты (0,41 %,  $t_r$  14,64 мин), кониферилового спирта (1,11 %,  $t_r$  14,31 мин), дигидроактинидиолида (4,4,7а-триметил-5,6,7,7а-тетрагидро-2(4Н)-бензофуранон, 0,06 %,  $t_r$  12,86 мин), пентакозана (0,37 %,  $t_r$  20,02 мин), фитола и его изомеров (2,81 %,  $t_r$  14,54 мин; 0,44 %,  $t_r$  14,71 мин; 1,12 %,  $t_r$  14,87 мин; 0,59 %,  $t_r$  16,47 мин), пальмитиновой (3,59 %,  $t_r$  15,46 мин), линолевой (1,04 %,  $t_r$  16,66 мин),  $\alpha$ -линоленовой кислот (0,94 %,  $t_r$  16,72 мин),  $\beta$ -амирина (10,9 %,  $t_r$  50,65 мин) и его ацетата (5,5 %,  $t_r$  56,18 мин).

Разделение хлороформной фракции (20 г) (рис. 2) осуществляли методом колоночной хроматографии на силикагеле (L 100/250 Lachema) в соотношении образец — сорбент 1:10, элюируя хлороформом и смесью хлороформ — этанол (с градиентным увеличением количества последнего, 98:2  $\rightarrow$  80:20). В результате получено 4 подфракции (I – IV). Колоночному разделению на силикаге-

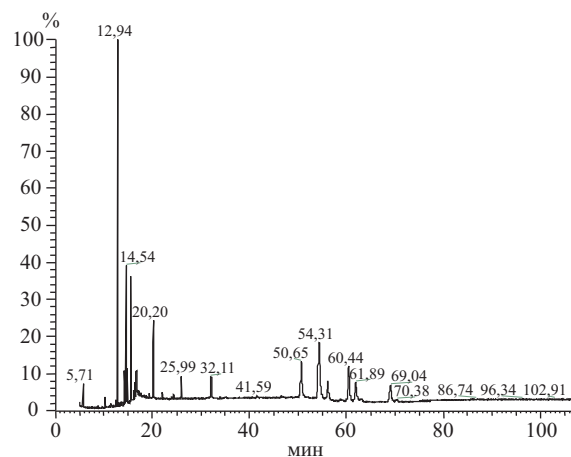


Рис. 1. ГХ-хроматограмма хлороформной фракции экстракта альфредии поникшей на 95 % этаноле. По оси абсцисс — время, мин. По оси ординат — относительная интенсивность, %.

ле подвергли подфракции II и III, содержащие преимущественно тритерпеновые и фенольные соединения, представляющие наибольший интерес.

Первоначальное элюирование хлороформом способствовало выделению подфракции I (выход 27 %), после обработки которой метанолом и декантации раствора получили жирное масло (выход 12,3 % от фракции), в ИК-спектре (KBr),  $\nu_{\max}$ ,  $\text{см}^{-1}$ : 1099, 1165 (ОН), 1239, 1376, 1417, 1464 (сильная) ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}$ ), 1650 ( $\text{C}=\text{C}$ ), 1742 (сильная;  $\text{C}=\text{O}$  сл. эф.), 2855, 2926, 3009 (сильные;  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ ), 3471 (слабая; ОН), что подтверждает наличие в его составе преимущественно эфиров насыщенных и ненасыщенных высших жирных кислот.

В подфракции II (выход 39 %), элюированной далее хлороформом, по данным хроматографии в тонком слое, обнаружили не менее 6 веществ тритерпеновой и стеринной природы. По хроматографической подвижности в тонком слое и на бумаге, в сравнении с достоверными образцами, в подфракции идентифицировали  $\beta$ -ситостерин, ванилиновую и коричную кислоты. По данным ГХ/МС в подфракции II (рис. 3) выявили наличие 4 доминирующих и близких по структуре веществ тритерпеновой структуры (98,54 %,  $t_r$  53,58 – 66,96 мин) с ( $M^+$ ) 426 ( $m/z$ , ЭУ, 70 eV), одним из которых является  $\beta$ -амирин (олеан-12-ен-3-ол, 30,07 %,  $t_r$  53,58 мин). Кроме того, нами выявлено присутствие *o*-ксилола (0,02 %,  $t_r$  5,87 мин), капроновой кислоты (0,03 %,  $t_r$  6,58 мин), 3-карена (0,01 %,  $t_r$  7,31 мин), диметилсукцината (0,03 %,  $t_r$  7,41 мин), *m*-крезола (0,01 %,  $t_r$  7,7 мин), диметилового эфира азелаиновой кислоты (0,11 %,  $t_r$  12,55 мин), диэтилфталата (1,1 %,  $t_r$  13,11 мин). При рехроматографии подфракции II на силикагеле (L 100/250 Lachema) в соотношении образец — сорбент 1:20, элюенты — гексан и смесь гексан — ацетон с возрастающим градиентом гидрофильности (98:2  $\rightarrow$  90:10), выделили однородную, по хроматографической картине в тонком слое, смесь веществ 1 – 4.

Разделение подфракции III (выход 23 %), элюированной смесью хлороформ – этанол, 9,3:0,7 – 9:1, и содержащей не менее 6 фенольных соединений, производили методом колоночной хроматографии на силикагеле (L 40/100 Lachema) при соотношении образец — сорбент 1:25. Элюирование проводили хлороформом, системой

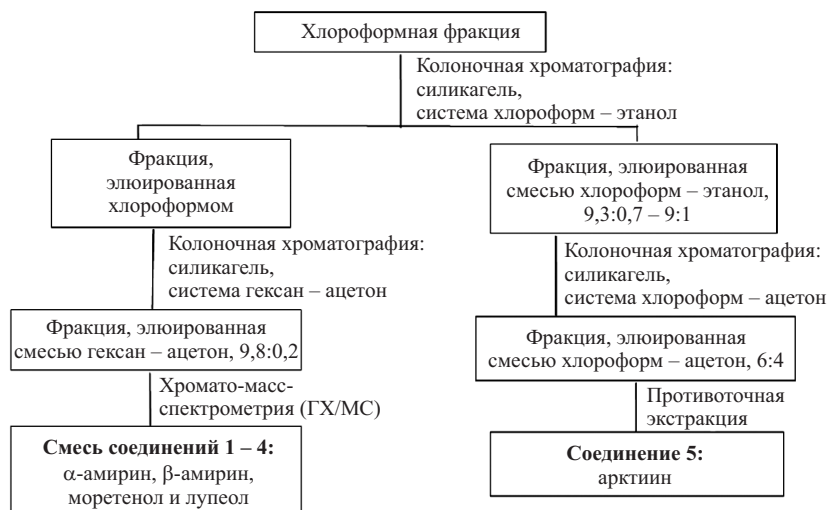


Рис. 2. Схема выделения веществ из хлороформной фракции экстракта альфредии поникшей на 95 % этаноле

хлороформ — ацетон (с градиентным увеличением количества последнего, 98:2 → 50:50). При промывании колонки смесью хлороформ — ацетон 6:4 с последующим противоточным распределением в системе растворителей хлороформ — метанол — вода (5:6:4) из нижней фазы получили индивидуальное вещество **5** — доминирующее во фракции.

В подфракции IV (выход 10 %), полученной при элюировании смесью хлороформ-этанол 8,5:1,5 – 7:3, с использованием качественных реакций, хроматографии в тонком слое и на бумаге с достоверными образцами обнаружены кумарины (в т.ч. эскулетин), органические кислоты (кофейная, преобладающая — хлорогеновая), а также установлено присутствие простых фенолов.

**Смесь веществ 1 – 4** — белый мелкокристаллический порошок, т. пл. 160 – 161 °С (этанол), растворимый в гексане, хлороформе, нерастворимый в этаноле, метаноле и воде. УФ-спектр ( $C_6H_{14}$ ),  $\lambda_{max}$ , нм: 210, (220). ИК-спектр

(KBr),  $\nu_{max}$ ,  $cm^{-1}$ : 1043, 1072, 1085, 1110, 1138 (ОН), 1189, 1217, 1253, 1273, 1298, 1360, 1381, 1454, 1463 ( $CH_3$ ,  $CH_2$ ,  $CH$ ), 1641 ( $C=C$ ), 2660, 2725 (ОН), 2872, 2962 ( $CH_3$ ,  $CH_2$ ,  $CH$ ), 3387, 3614 (ОН). Выход — 1,6 г. На пластинке “Silufol UV-254” в системах растворителей хлороформ — метанол, 25:3, и гексан — ацетон, 8:2, имеет 1 пятно красно-фиолетового цвета с  $R_f$  0,70 и 0,45 соответственно. Разделение указанной смеси явилось сложной экспериментальной задачей, поэтому для исследования применяли метод ГХ/МС. В результате во фракции идентифицировали β-амирин (олеан-12-ен-3-ол, 27,48 %,  $t_r$  53,58 мин), α-амирин (урс-12-ен-3-ол, 27,52 %,  $t_r$  57,72 мин), моретенол (гоп-22(29)-ен-3β-ол, 25,52 %,  $t_r$  66,11 мин) и лупеол (луп-22(29)-ен-3β-ол, 19,48 %,  $t_r$  66,96 мин).

**Вещество 5** — белый мелкокристаллический порошок,  $C_{27}H_{34}O_{11}$ ; т. пл., °С (хлороформ — гексан, 1:2): 86 (газ. выдел.), 250 (с разл.); растворимый в хлороформе, ацетоне, этаноле и метаноле, не растворимый в гексане и воде. УФ-спектр ( $C_2H_5OH$ ),  $\nu_{max}$ , нм: 224, 255, (274), (298). ИК-спектр (в пленке  $CHCl_3$ ),  $\nu_{max}$ ,  $cm^{-1}$ : 1026, 1074, 1140, 1157 (пиранозное кольцо), 1194, 1235, 1264 ( $C-O-C$ ), 1332, 1349, 1383, 1421, 1453, 1464 ( $CH_3$ ,  $CH_2$ ,  $CH$ ), 1515, 1592, 1606 (аром.), 1766 ( $\gamma$ -лактонный цикл, лактонный карбонил), 2855 ( $OCH_3$  аром.), 2839, 2921 ( $CH_3$ ,  $CH_2$ ), 3419 (ОН). Выход 0,1 г. На пластинке “Silufol UV-254” в системах растворителей хлороформ — этанол, 8:1 и этилацетат — этанол (8:1) проявляется в виде пятна розового цвета диазореактивом и темно-серого — ванилин-фосфорным реактивом с  $R_f$  0,10 и 0,20 соответственно. В продуктах кислотного гидролиза методом хроматографии в тонком слое и на бумаге обнаружили агликон с  $R_f$  0,35 и 0,45 соответственно (“Silufol UV-254”, хлороформ — этанол, 8:1 и этилацетат — этанол, 8:1, диазореактив) и углеводный компонент — D-глюкоза ( $R_f$  0,27, бумага “Ленинградская М”, бутанол-1 — пиридин — вода 6:4:3, анилинфталат). ЯМР спектр  $^{13}C$  содержит 27 сигналов, из которых 6 четвертичных и 6 третичных ароматических, 6 принадлежат молекуле глюкозы (табл. 1). В молекуле содержится также алифатический компонент, состоящий из 6 углеродных атомов. 3 из них принадлежат метиленовым группам, одна из которых является

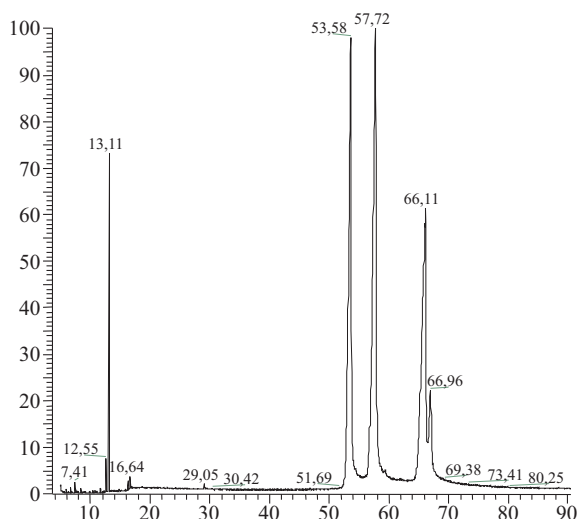


Рис. 3. ГЖ-хроматограмма фракции, содержащей сумму три-терпеновых соединений, полученной из хлороформной фракции экстракта альфредии поникшей на 95 % этаноле. По оси абсцисс — время, мин. По оси ординат — относительная интенсивность, %

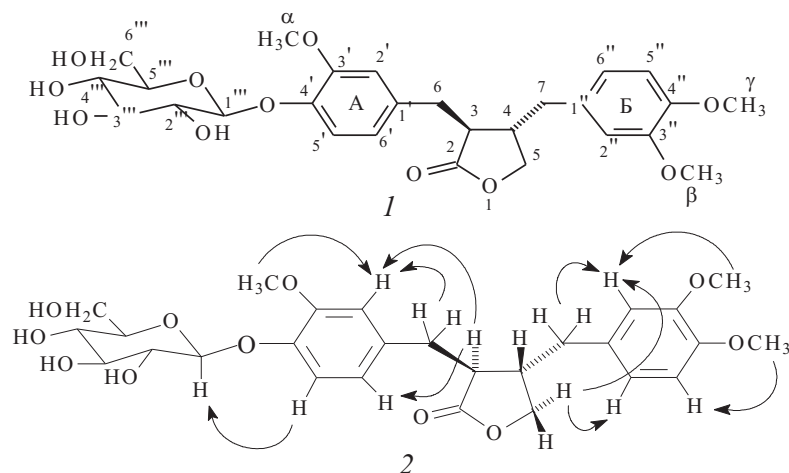


Рис. 4. Структурная формула соединения **5** (1) и кросс-пики, вызванные ядерным эффектом Оверхаузера (2).

карбинольной. В алифатический фрагмент входит также карбонильная группа и 2 третичных углеродных атома. Кроме того, в соединении присутствуют 3 метоксильные группы. Химический сдвиг карбонильной группы 178,7 м. д. и полоса поглощения в ИК-спектре  $1766\text{ см}^{-1}$  предполагает наличие  $\gamma$ -лактонного фрагмента. Анализ одно- и двухмерных спектров ЯМР показал, что в веществе содержатся несвязанные между собой 2 тризамещенных ароматических кольца. Химические сдвиги атомов углерода скоррелированы с сигналами протонов с использованием метода HSQC (табл. 1). Основные сведения о химической структуре вещества получены путем анализа двухмерных спектров COSY и HMBC. В последнем спектре сигнал карбонильной группы дает кросс-пики с протонами метиленовой группы H5. Один из них в спектре ПМР проявляется в виде дублета дублетов при 4,09 м. д., а другой перекрывается сигналами протонов моносахарида. Согласно спектру HSQC данной метиленовой группе соответствует сигнал 71,27 м. д. в спектре ЯМР  $^{13}\text{C}$ . Кроме того, в спектре HSQC имеются кросс-пики, связывающие протон H5 с углеродными атомами метиленовых групп при C6 и C7 (34,48 и 38,10 м. д.). Так как сигнал 38,10 м. д. имеет также кросс-пик с протонным дублетом 6,47 м. д., то можно сделать вывод, что указанная метиленовая группа присоединена к ароматическому кольцу Б. Тип замещения в нем следует из данных спектра COSY. Две из 3 имеющихся метоксильных групп также принадлежат этому кольцу, т.к. наблюдаются кросс-пики их водородных атомов с сигналами  $^{13}\text{C}$  этого же кольца. Значения химических сдвигов углеродов кольца Б определены из спектра HSQC (табл. 1). Особенностью спектров вещества **5** явилось наличие кросс-пиков всех 3 метоксильных групп с соседними протонами ароматических колец в спектре COSY, что явилось дополнительным подтверждением их локализации как в кольце Б, так и в кольце А. В последнем метоксильная группа дает кросс-пик с дублетом при 6,61, принадлежащим протону H2'. Так как тип замещения в кольце А такой же, как и в другом ароматическом цикле, то для присоединения молекулы глюкозы остается положение C4', соответствующее сигналу с 145,15 м. д. в спектре ЯМР  $^{13}\text{C}$ , что подтверждается наличием в спектре HMBC кросс-пики с сигналом аномального протона молекулы глюкозы 4,78 м. д. Относитель-

ная стереохимия молекулы **5** определена путем анализа спектров ROESY. *транс*-Расположение бензилильных заместителей по отношению к лактонному циклу следует из того, что в этих спектрах ROESY и NOESY отсутствуют кросс-пики между протонными сигналами групп C6 и C7. Все остальные кросс-пики, вызванные ядерным эффектом Оверхаузера, показаны стрелками на рис. 4. Протоны H3; H4 и H5 $\alpha$  взаимодействуют с протонами H3'; H6' и H3''; H6'' ароматических ядер, что свидетельствует о свободном вращении циклов по осям C6–C1' и C7–C1''. Таким образом, на основании физических, спектральных и хроматографических характеристик установлена структура вещества **5** – 3-(3-метокси-4- $\beta$ -D-глюкопиранозилоксибензил)-4-(3,4-диметоксибензил)бутиролактон (арктиин).

#### Экспериментальная биологическая часть

В выполненном эксперименте гипоксическое воздействие вызывает нарушение когнитивного поведения животных, что выразилось в достоверном уменьшении показателей ориентировочно-исследовательского поведения, особенно норкового рефлекса и горизонтальных перемещений, при одновременном наличии тенденции к возрастанию смещенной активности (груминга); уменьшению латентного времени захода в темный отсек при выработке рефлекса и снижении его сохранности в группе гипоксического контроля (табл. 2, 3).

Использование хлороформной фракции увеличивает латентное время пребывания животных в условиях гермокамеры до агонального состояния, а применение экстракта растения и выделенных веществ не оказывает влияния на данный показатель (табл. 3).

Курсовое введение экстракта альфредии, его хлороформной фракции и индивидуальных веществ способствует увеличению латентного времени захода в темный отсек при выработке УРПИ в сравнении с гипоксическим контролем, что свидетельствует о сохранности ориентировочного рефлекса у животных после перенесенной гипоксии.

В “открытом поле” после гипоксической травмы (табл. 2) сумма тритерпеновых спиртов, хлороформная фракция и вещества альфредии не оказывают значительного влияния на эксплоративное поведение животных.

Однако для экстракта альфредии и его фракции отмечается тенденция к возрастанию норкового рефлекса и снижению коэффициента асимметрии. Экстракт и фракция также имеют тенденцию к снижению груминга, а сумма тритерпеновых спиртов вызывает его достоверное

уменьшение, экстракт и арктиин способствуют уменьшению количества дефекаций.

Экстракт альфредии, его хлороформная фракция и выделенные вещества обладают антиамнестическими свойствами после перенесенной гипоксии (табл. 3). Так, при

Таблица 1

**Химические сдвиги и корреляции в молекуле соединения 5**

Атом	Химические сдвиги (м. д.), КССВ (Гц)		COSY	HSQC	HMBC
	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H			
2	178,7	–	–	–	H5
3	46,52	2,43, м.	H6	2,43\46,52	C4
4	41,19	2,52, м.	H7	2,52\41,19	C3
5	71,27	4,09, дд., 9,2; 7,7. 3,8, м.	H4	4,09, 3,8\71,27	C3, C7
6	34,48	2,83, м.	H3	2,83\34,48	C3, C4
7	38,10	2,63, дд., 13,7, 6,3. 2,50, м.	H4	2,50, 2,63\38,10	C2'', C6''
1'	133,24	–	–	–	H2', H5'
2'	113,34	6,61, д., 1,6	H6'	6,61\113,34	C1', C4'
3'	149,53	–	–	–	H5', β
4'	145,15	–	–	–	H3', H5', H1'''
5'	117,85	6,88, д., 8,2	H6'	6,88\117,85	C2', C4'
6'	121,92	6,53, дд., 8,2, 1,8	H2', H5'	6,53\121,92	C1', C3', C4'
1''	130,05	–	–	–	H2'', H5''
2''	112,05	6,47, д., 1,8	H6''	6,47\112,05	C1'', C4'', C3''
3''	149,13	–	–	–	H2'', H5'', H6'', α
4''	148,00	–	–	–	H2'', H5'', H6'', γ
5''	111,54	6,73, д., 8,2	H6'', γ	6,73\111,54	C1'', C2'', C3'', C4'', C5'', α
6''	120,74	6,55, дд., 8,2, 1,7	H2'', H5''	6,55\120,74	C3'', C4''
1'''	102,10	4,78, д., 7,40	H2'''	4,78\102,10	145,15
2'''	73,31	–	–	–	–
3'''	76,24*	–	–	–	–
4'''	69,49	–	–	–	–
5'''	76,98*	–	–	–	–
6'''	61,64	–	–	–	–
α	56,01	3,67, с.	H2'	3,67\56,01'	C3'
β	56,07	3,77, с.	H2''	3,77\56,07	C3''
γ	56,07	3,80, с.	H5''	3,80\56,07	C4''

\* Значения взаимозаменяемы.

Таблица 2

**Влияние экстракта альфредии поникшей на 95 % этаноле, его хлороформной фракции и индивидуальных веществ на ориентировочно-исследовательское поведение мышей (через 30 мин после гипоксии) (n = 10)**

Группа наблюдения, доза	Количество через 30 мин после гипоксии (n = 10)						Коэффициент асимметрии поведения
	Суммарная двигательная активность	Горизонтальная активность	Вертикальная активность	Норковый рефлекс	Груминг	Дефекация	
Интактный контроль	87,0 ± 5,9*	54,4 ± 4,1*	8,0 ± 1,9	21,4 ± 1,8*	0,3 ± 0,2	1,1 ± 0,5	0,64 ± 0,01
Гипоксический контроль	46,7 ± 8,1	29,0 ± 5,2	4,3 ± 1,2	10,9 ± 1,6	0,9 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,64 ± 0,02
Экстракт альфредии, 100 мг/кг	33,0 ± 12,4	17,7 ± 7,8	1,6 ± 1,0	13,4 ± 2,2	0,5 ± 0,2	0*	0,37 ± 0,12
Хлороформная фракция, 31,4 мг/кг	34,0 ± 12,7	20,1 ± 6,9	1,7 ± 1,0	13,2 ± 1,5	0,5 ± 0,3	0,2 ± 0,1	0,41 ± 0,10
Сумма тритерпеновых спиртов, 7 мг/кг	33,0 ± 10,7	22,5 ± 7,2	1,7 ± 1,1	8,7 ± 2,2	0,4 ± 0,2*	0,2 ± 0,1	0,64 ± 0,04
Арктиин, 1 мг/кг	34,3 ± 12,8	16,2 ± 4,6	1,4 ± 0,5	7,8 ± 3,7	1,3 ± 0,4	0*	0,63 ± 0,03

\* p ≤ 0,05 по сравнению с гипоксическим контролем.

**Влияние экстракта альфредии поникшей на 95 % этаноле, его хлороформной фракции и индивидуальных веществ на время пребывания мышей в условиях гермокамеры, выработку и сохранность УРПИ после гипоксического воздействия ( $n = 10$ )**

Группа наблюдения, доза	Латентное время гипоксии, мин	Латентное время захода в темный отсек при выработке рефлекса, с	Доля животных с сохранившимся рефлексом при проверке, %			
			после выработки			
			48 ч	7 сут	14 сут	21 сут
Интактный контроль	–	38,9 ± 6,4*	90*	90*	80*	80*
Гипоксический контроль	43,9 ± 1,8	12,7 ± 3,0	30	20	20	10
Экстракт альфредии, 100 мг/кг	42,7 ± 2,0	19,5 ± 2,4*	100*	90*	80*	90*
Хлороформная фракция, 31,4 мг/кг	59,0 ± 5,3*	22,8 ± 4,0*	100*	100*	80*	70*
Сумма тритерпеновых спиртов, 7,0 мг/кг	38,1 ± 4,4	28,7 ± 5,2*	100*	90*	80*	70*
Арктиин, 1,0 мг/кг	43,1 ± 1,9	24,8 ± 5,1*	90*	90*	80*	70*

\*  $p \leq 0,05$  по сравнению с гипоксическим контролем.

проверке сохранности УРПИ через 48 ч, на 7 и 14 сут после обучения во всех тестируемых группах животных обнаружили воспроизводимость рефлекса на уровне значений интактных животных или даже выше их, в отличие от группы гипоксического контроля. К 21 сут воспроизводимость УРПИ постепенно снижается при использовании хлороформной фракции, суммы тритерпеновых спиртов и арктиина. Максимальную сохранность проверяемого рефлекса на протяжении всего эксперимента проявил экстракт, при введении которого доля животных с сохранившимся УРПИ находится выше уровня интактного контроля.

Таким образом, фармакологическая активность хлороформной фракции экстракта альфредии поникшей обусловлена особенностями химической структуры простых фенолов, лигнанов, органических кислот и их производных, тритерпеновых соединений, входящих в её состав.

Авторы выражают благодарность доктору хим. наук, зав. лабораторией медицинской химии Новосибирского

института органической химии СО РАН Шульц Эльвире Эдуардовне за помощь в организации аналитических исследований и обсуждении полученных результатов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Патент РФ 2347580; *Бюл. изобрет.*, № 6 (2009).
2. Р. Н. Мустафин, Н. И. Суслов, И. В. Шилова и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **73**(1), 16 – 18 (2010).
3. Р. Н. Мустафин, И. В. Шилова, Н. И. Суслов и др., *Бюл. экпер. биол. и мед.*, **150**(9), 302 – 304 (2010).
4. И. В. Шилова, *Вестн. РУДН, Медицина*, **6**, 236 – 240 (2007).
5. И. В. Шилова, Н. В. Кувачёва, Е. И. Короткова и др., *Раст. ресурсы*, **44**(1), 114 – 121 (2008).
6. В. П. Амельченко, И. В. Шилова, Н. В. Кувачёва, *Раст. ресурсы*, **45**(2), 23 – 31 (2009).
7. Р. У. Хабриев (ред.), *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Медицина, Москва (2005).

Поступила 14.12.10

## ISOLATION, IDENTIFICATION AND NOOTROPIC ACTIVITY OF ALFREDIA CERNUA CHLOROFORM EXTRACT FRACTION

I. V. Shilova<sup>1</sup>, A. A. Semenov<sup>2</sup>, N. V. Kuvacheva<sup>3</sup>, N. I. Suslov<sup>1</sup>, and R. N. Mustafin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Pharmacology, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk, Russia;

<sup>2</sup> Irkutsk State Technical University, Irkutsk, Russia;

<sup>3</sup> Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia

The chemical composition of the chloroform fraction of the total 95%-ethanol extract of *Alfredia cernua* (L.) Cass overground part includes triterpene alcohols ( $\alpha$ -amyrin,  $\beta$ -amyrin, moratinol, lupeol) and butyrolignan (arctiin), as well as various simple phenols, organic acids, and their esters. It is established that triterpene alcohols and arctiin demonstrate a marked nootropic activity. The activity of triterpene alcohols and arctiin is comparable with that of the whole chloroform fraction.

**Key words:** Triterpene alcohols, arctiin, nootrope activity, *Alfredia cernua* (L.) Cass.